

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Biologie (BBI)



Anna Ledvinková

NK buňky a KIR receptory: jejich význam v transplantacích hematopoetických kmenových
buněk u leukemií

NK cells and KIR receptors: their importance in haematopoietic stem cell transplantations
in leukemia

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce: Ing. Milena Vraná

Praha, 2019

Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala vedoucí mé bakalářské práce, Ing. Mileně Vrané za trpělivost, věnovaný čas, ochotu, cenné rady a připomínky, jež mi při zpracování práce pomohly. Také bych ráda poděkovala svému partnerovi Patriku Lenzovi za podporu a trpělivost, kterou se mnou měl v průběhu tvorby této práce.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze 30. 4. 2019

.....

Podpis

NK buňky a KIR receptory: jejich význam v transplantacích hematopoetických kmenových buněk u leukemií

Abstrakt

Tato bakalářská práce pojednává o významu NK (natural killer) buněk u leukemií. Je zaměřena na strukturu a reaktivitu NK buněk, a především pak na transmembránové KIR receptory (killer cell immunoglobuline-like receptors) NK buněk, které hrají důležitou roli v likvidaci leukemických buněk (reakci štěpu proti leukemii, GvL) a tedy v celkové prognóze nemoci. Aktivační a inhibiční receptory KIR svou kooperací řídí cytotoxickou aktivitu NK buněk. Typizací genů pro KIR receptory u dárců hematopoetických kmenových buněk tak lze předpovědět úspěšnost léčby. Vyšetření genů KIR se využívá především u pacientů diagnostikovaných akutní myeloidní leukemií.

Klíčová slova: KIR receptor, NK buňky, transplantace hematopoetických kmenových buněk, HSCT, leukémie, donor, recipient

NK cells and KIR receptors: their importance in haematopoietic stem cell transplantations in leukemia

Abstract

This bachelor thesis discusses the importance of NK (natural-killer) cells in leukemias. It focuses on the structure and reactivity of NK cells, and especially on transmembrane KIR receptors (killer cell immunoglobulin-like receptors) of NK cells, that play an important role in the elimination of leukemic cells (graft-versus leukemia reaction, GvL) and thus in the overall prognosis of the disease. Activation and inhibitory receptors of KIR, by their cooperation, control the cytotoxic activity of NK cells. Thus, the typing of KIR receptor genes in hematopoietic stem cell donors can predict treatment success. KIR genes examination is mainly used in patients diagnosed with acute myeloid leukemia.

Keywords: KIR receptor, NK cells, haematopoietic stem cell transplantation, HSCT, leukemia, donor, recipient

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	i
SEZNAM OBRÁZKŮ	iii
SEZNAM TABULEK	iv
Kapitola 1 Úvod.....	1
1.1 Cíle a struktura práce.....	2
Kapitola 2 NK buňky.....	3
2.1 Vlastnosti NK buněk.....	3
2.2 Aktivita NK buněk	4
2.3 Receptory NK buněk.....	5
2.3.1 HLA specifické inhibiční receptory	7
2.3.2 HLA nespecifické aktivační receptory	7
2.4 Edukace a tolerance NK buněk	8
Kapitola 3 KIR receptory.....	10
3.1 KIR geny	10
3.1.1 KIR A a B haplotypy	11
3.1.2 Organizace KIR genů a struktura jejich proteinových produktů	13
3.2 Inhibiční KIR receptory a jejich ligandy	14
3.3 Aktivační KIR receptory a jejich ligandy	15
Kapitola 4 Uplatnění KIR receptorů v HSCT u leukemií	17
4.1 Alogenní transplantace hematopoetických kmenových buněk	17
4.2 Úloha NK buněk v alogenní transplantaci u leukemií	17
4.2.1 Transplantace HSC u pacientů s leukémií	17

4.2.2	Aloreaktivita NK buněk při HSCT.....	18
4.3	Úloha KIR receptorů v HSCT u akutní myeloidní leukemie	19
Kapitola 5	Závěr	23
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	24
	SEZNAM INTERNETOVÝCH ZDROJŮ	30

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ADCC	<i>antibody-dependent cellular cytotoxicity</i> / buněčná cytotoxicita závislá na protilátce
aKIR	aktivační KIR receptor
ALL	akutní lymfoblastická leukemie
AML	akutní myeloidní leukemie
CCL	<i>chemokine ligand</i> / chemokinový ligand
CD	<i>cluster of differentiation</i> / diferenční skupina molekul
CML	chronická myeloidní leukemie
CY	cyklofosfamid
DFS	<i>disease free survival</i> / bezpříznakové přežití
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony stimulating factor</i> / granulocytomakrofágový kolonie-stimulující faktor
GvHD	<i>graft versus host disease</i> / reakce štěpu proti nemoci hostitele
GvL	<i>graft versus leukemia</i> / reakce štěpu proti leukemickým buňkám
HSC	<i>hematopoietic stem cell</i> / hematopoetické kmenové buňky
HSCT	<i>hematopoietic stem cell transplantation</i> / transplantace hematopoetických kmenových buněk
HvG	<i>host versus graft</i> / reakce hostitele proti štěpu
IFN- γ	interferon γ
iKIR	inhibiční KIR receptor
ILT	<i>immunoglobulin-like transcripts</i> / imunoglobulinu podobné transkripty
ITAMs	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motifs</i> / aktivační motivy imunoreceptorů založených na tyrosinu

ITIMs	<i>immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs</i> / inhibiční motivy imunoreceptorů založených na tyrosinu
KIR	<i>killer immunoglobulin-like receptor</i> / imunoglobulinu podobný receptor přirozeně zabíječských buněk
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> / hlavní histokompatibilní komplex
NCAM	<i>neural cell adhesion molecule</i> / molekula adheze nervových buněk
NCR	<i>natural cytotoxicity receptors</i> / receptory přirozené cytotoxicity
NK	<i>natural killer</i> / přirozeně zabíječská (buňka)
PCR-SSP	<i>polymerase chain reaction with sequence-specific primers</i> / polymerázová řetězová reakce se sekvenčně specifickými primery
Tc	<i>cytotoxic T cell</i> / cytotoxická T buňka
TKD	transplantace kostní dřeně
TLR	toll-like receptory
TNF	tumor nekrotizující faktor
URD	<i>unrelated donor</i> / nepříbuzný dárce

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1:	Rozpoznávání antigenů NK buňkami a jejich reaktivita	5
Obr. 2:	Ladění reakce NK buněk: Reostat model	9
Obr. 3:	Rozšířený komplex leukocytového receptoru (19q13.4) a KIR haplotyp	11
Obr. 4:	Pořadí KIR genů v KIR lokusu	12
Obr. 5:	Příklad pořadí genů plně osekvenovaného KIR haplotypu A a B	12
Obr. 6:	Struktura domén KIR receptorů	13
Obr. 7:	Specifické snížení relapsu a zlepšení DFS u dárců s Cen-B/B po transplantaci pro AML, ale ne pro ALL.....	21

SEZNAM TABULEK

Tab. 1:	Receptory exprimované na lidských NK buňkách	6
Tab. 2:	Ligandy aktivačních a inhibičních KIR receptorů.....	16
Tab. 3:	Výsledky transplantací s a bez KIR-ligand inkompatibility dárce a příjemce	20

Kapitola 1

Úvod

Přirozeně zabíječské (*natural killer, NK*) buňky jsou jednou z populací lymfocytů. Díky svým cytotoxickým granulám jsou schopny ničit virem napadené a nádorově transformované buňky. Tato jejich schopnost je důležitá pro léčbu leukémií, neboť některé receptory NK buněk jsou schopné při transplantaci hematopoetických kmenových buněk rozpoznat chybějící nebo snížené množství svých ligandů, MHC (*major histocompatibility complex*) antigenů I. třídy, na leukemických buňkách a následně je lyzovat. Receptory přítomné na dárcovských NK buňkách tedy ovlivňují průběh transplantace hematopoetických kmenových buněk ve smyslu reakce štěpu proti leukémii (*graft versus leukemia, GvL*) a tím se podílejí na celkovém průběhu léčby a dlouhodobé prognóze nemoci. NK buňky také mohou ovlivňovat přihojení transplantátu prostřednictvím reakce hostitele proti štěpu (*host versus graft, HvG*) a štěpu proti hostiteli (*graft versus host disease, GvHD*).

NK buňky exprimují mnoho typů receptorů podílejících se na obraně organismu. Podle typu reakce, která je vyvolána po setkání daného receptoru s odpovídajícím ligandem, rozeznáváme skupinu aktivačních a skupinu inhibičních receptorů. Především pro léčbu akutní myeloidní leukémie jsou zásadní receptory imunoglobulinové povahy, tzv. killer immunoglobulin-like receptory (KIR).

KIR receptory jsou transmembránové proteinové struktury, které se podle počtu imunoglobulinu podobných domén dělí na 2D a 3D skupinu. Dále je rozlišována délka jejich cytoplasmatických ocásků ovlivňujících aktivitu receptorů ve smyslu aktivace nebo inhibice cytotoxické aktivity NK buněk. Do současnosti bylo objeveno 17 různých KIR receptorů.

Geny KIR receptorů jsou lokalizovány na chromozomu 19 a vykazují stejně jako geny MHC glykoproteinů, resp. HLA, vysoký polymorfismus, který má za následek rozdílné frekvence alel napříč populacemi a rozdílnou afinitu KIR receptorů k jejich ligandům. Haplotypy A a B KIR genů mají specifické centromerické a telomerické genové motivy. Některé z těchto motivů u dárců mají pozitivní přínos pro průběh transplantace hematopoetických kmenových buněk. Nejlepších výsledků je dosahováno při transplantacích s inkompatibilitou KIR a MHC tř. I ligandů dárce a příjemce a od B/B homozygotních dárců.

1.1 Cíle a struktura práce

Hlavním cílem této práce je popsat KIR receptory NK buněk, které hrají důležitou roli v aloreaktivitě těchto buněk. Tyto imunoglobulinu podobné receptory, tzv. KIR, jsou kódovány KIR geny. Posláním práce je popsat NK buňky jako takové, receptory NK buněk, edukaci NK buněk, a především pak funkci NK buněk v obraně před nádorovým bujením lymfocytů za pomoci KIR receptorů.

Práce popisuje jednotlivé haplotypy KIR genu a jejich vliv na prognózu léčby leukemií. Dále práce pojednává o reakcích KIR receptorů s leukemickými buňkami hostitele v případě alogenní transplantace hematopoetických kmenových buněk. Část práce dává do kontextu vývoj transplantací hematopoetických kmenových buněk s objasněním významu reaktivity NK buněk proti leukemickým blastům. Samostatná kapitola se zabývá vybranými KIR geny a jejich alelami a také vyšetřením KIR genů a jeho přínosem u různých hematologických diagnóz, především akutní myeloidní leukemie.

Kapitola 2

NK buňky

2.1 Vlastnosti NK buněk

NK buňky jsou velké granulární lymfocyty. Vyvíjejí se z lymfoidních progenitorových buněk a mají původ v kostní dřeni. Hlavním místem výskytu zralých NK buněk je periferní krevní oběh, kde tvoří asi 10-15 % všech lymfocytů (Middleton a Gonzelez, 2009). Progenitory NK buněk byly nalezeny i v dalších tkáních jako je brzlík, lymfatické uzliny, tonsily, děloha či játra. Jejich dysfunkce vede k rozvoji mnohých nemocí od infekčních onemocnění po maligní nádory (Cichocki, 2014).

NK buňky jsou typem bílých krvinek zajišťujících svou cytotoxickou aktivitou podobně jako cytotoxické T lymfocyty imunitní dohled především nad viry napadenými a nádorově transformovanými buňkami. Přispívají také významně k vaskularizaci placenty a remodelaci tkání (Hanna et al., 2006). Obvykle jsou považovány za složku buněčné vrozené imunity, protože nesou na svém povrchu antigenně nespecifické receptory. Na druhou stranu mohou být řazeny i mezi složky adaptivní imunity díky schopnosti paměti a zvýšené reaktivitě při opětovném setkání s patogenem stejně jako to dokážou cytotoxické T lymfocyty a B lymfocyty (Sun et al., 2009). Jsou schopné rozpoznat sníženou nebo chybějící expresi antigenů MHC I. třídy na povrchu abnormálních buněk (viz kapitola 2.4). V tomto ohledu se funkčně doplňují NK buňky s T lymfocyty v případě, že ty nejsou schopné takto transformované buňky rozpoznat.

Typický fenotyp buněčného povrchu odlišující lidské NK buňky od jiných lymfocytů na průtokovém cytometrickém analyzátoru ukazuje nepřítomnost CD3¹, čímž se odlišuje od T buněk a expresi CD56, 140 kDa izoformu molekul adheze nervových buněk (*the neural cell adhesion molecule, NCAM*) nalezených na většině NK buněk a menšině T buněk (Ritz et al., 1988).

V periferní krvi mohou být identifikovány dvě různé podmnožiny zralých NK buněk na základě density CD56 exprimovaných na jejich povrchu. Je to molekula patřící do imunoglobulinové rodiny a je archetypálním fenotypovým markerem přirozeně zabíječských buněk (van Acker et al., 2017).

¹ CD, zkr. pro *cluster of differentiation* – diferenční skupina molekul na povrchu buněk mající stejnou antigenní determinantu

Zatímco CD56^{dim2} v krvi vysoce převažují, menšina (5-15 %) je reprezentována CD56^{bright1}. CD56^{dim} NK buňky jsou CD16^{pos} KIR^{pos/neg3} CD94^{pos} (párované buď s NKG2A nebo NKG2C, viz podkapitola 2.3.2), zprostředkovávají cytotoxické odpovědi a uvolňují cytokiny. CD56^{bright} NK buňky jsou CD16^{neg} KIR^{neg} CD94/NKG2A^{pos} jsou necytolytické a produkují vysoké hladiny prozánětlivých cytokinů (Romagnani et al., 2007; Moretta, 2010). Existuje několik důkazů pro to, že CD56^{bright} dává vzniknout buňkám CD56^{dim} NK buňkám (Freud et al., 2017).

2.2 Aktivita NK buněk

NK-buňky jsou schopné cytolytické aktivity díky specifickým aktivačním membránovým receptorům. Po stimulaci NK buňky sekretují množství cytokinů zahrnující interferon γ (IFN- γ), tumor nekrotizující faktor (TNF α) či granulocytomakrofágový kolonie-stimulující faktor (GM-CSF). Sekretují také chemokiny jako je chemokinový ligand 3 (CCL3), CCL4 and CCL5. (Fauriat et al., 2010; Walzer et al., 2005). Ty jsou schopné aktivovat buňky prezentující antigen (APC), tj. makrofágy a dendritické buňky. NK buňky exprimují granula obsahují perforin a granzymy, které je předpokladem k masivní lýze cílových buněk (Chiang et al., 2013).

Aktivita NK buněk je regulována interakcemi s ostatními buňkami imunitního systému jako jsou T lymfocyty, dendritické buňky a makrofágy. IFN typu I, IL-12, IL-18 a IL-15 jsou možnými aktivátory NK buněčné efektorové funkce (Walzer et al., 2005). Cytotoxická aktivita NK buněk je značně regulována také inhibičními receptory, které se vážou na MHC I. třídy molekuly na cílových buňkách.

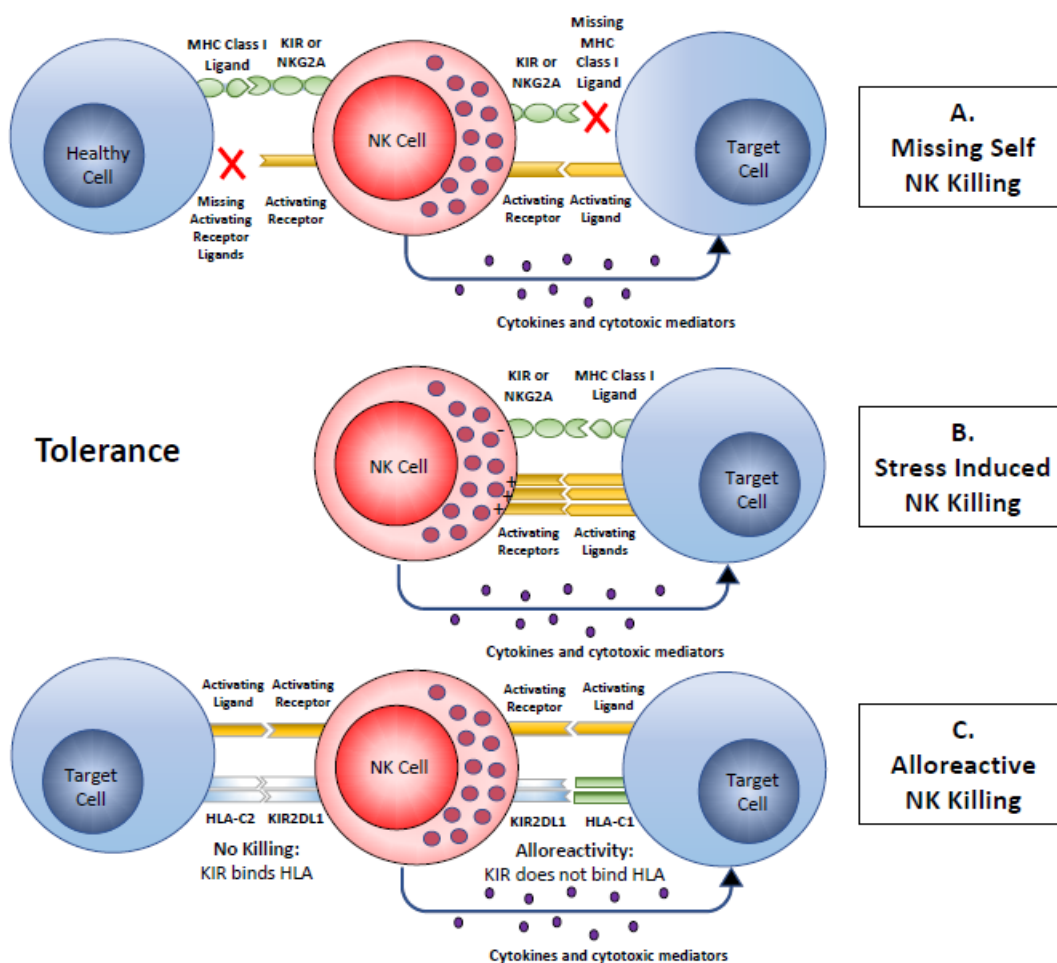
NK buňky skrze své receptory rozpoznávají jednak cizí antigeny – jedná se o tzv. „*nonself recognition*“, dále zvýšená množství proteinů pocházejících z vlastních nádorově transformovaných či infikovaných buněk, tzv. stresem indukovaných – „*self recognition*“, a také rozpoznávají vlastní buňky produkující proteinové molekuly ve sníženém množství (tzv. *downregulate*) v důsledku transformace či infekce - tzv. „*missing self recognition*“ (Walzer et al., 2005). Tento model a možnosti jeho vlivu na reaktivitu NK buněk popisuje obrázek 1.

Missing self recognition je hlavním mechanismem rozpoznávání leukemických buněk KIR receptory. Bylo zjištěno, že downregulace nebo chybění MHC I. třídy nestačí NK buňkám k aktivaci jejich cytotoxicity. Ke stimulaci reakce jsou potřeba aktivační receptory a jejich ligandy, které se nacházejí nejen na T a B lymfoblastech, ale i na dalších (zralých) buňkách kostní dřeně (Raulet, 2006).

² dim znamená v překladu šerý, bright zn. jasný

³ pos zn. pozitivní, neg zn. negativní

Obr. 1: Rozpoznávání antigenů NK buňkami a jejich reaktivita



Poznámky:

(A) Tolerance NK buněk závisí na inhibičních signálech MHC I. třídy exprimovaných zdravými buňkami, které se vážou s KIR nebo NKG2A, a na minimálním množství aktivačních signálů, které společně vedou k toleranci. Maligní transformace nebo virová infekce podporuje usmrcování cílových buněk downregulací exprese MHC třídy I a upregulací signálů aktivačních receptorů NK buněk. (B) Ačkoli v některých případech nedochází k MHC downregulaci, může NK buňka stále zabíjet cílové buňky díky změně rovnováhy upregulací aktivačních ligandů způsobené stresem. (C) Rovnováha mezi inhibicí a aktivací může být ovlivněna při transplantacích výběrem dárců, kteří budou reagovat na chybějící vlastní HLA třídu I u HLA neshodných příjemců. (upraveno dle Cooley, Parham a Miller, 2018)

2.3 Receptory NK buněk

Efektorové funkce NK buněk jsou zprostředkovávány a regulovány limitovaným množstvím povrchových receptorů, které jsou kódovány v zárodečné linii těchto buněk (Vivier et al., 2011). Aktivační receptory interakcí s příslušným ligandem indukují vylití cytotoxických granúl z NK buňky. Tuto aktivaci NK buněk vyvažují tzv. inhibiční receptory, které se vážou na MHC antigeny I. třídy zdravých buněk; využíváním společné dráhy pro efektorové funkce NK buněk zabraňují jejich cytotoxické aktivitě (Long, 2008).

Souhrou funkcí aktivačních a inhibičních receptorů jsou NK buňky schopny imunitního dozoru nad buňkami s potlačenou expresí MHC I. třídy (missing self recognition, viz kapitola 2.2). Touto

schopností přirozené cytotoxicity („*natural killer*“) NK buňky doplňují imunitní funkci T lymfocytů (Ljunggren a Kärre, 1990). Kromě toho exprese nízoafinitního Fc receptoru CD16 na NK buňkách zprostředkovává buněčnou cytotoxicitu závislou na protilátkách (*antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC*). V závislosti na reakcích B lymfocytů může ADCC též přispět k imunosupresi infikovaných buněk (Cichocki et al., 2015).

Na lidských NK buňkách bylo doposud nalezeno osm různých aktivačních receptorů, pět imunoglobulinu podobných a tři lektinu podobné. Skupina inhibičních receptorů zahrnuje imunoglobulinovou nadrodinu KIR receptorů, imunoglobulinu podobné transkripty (*immunoglobulin-like transcripts, ILT*) a lektinu podobné receptory NKG2A/NKG2B (tab. 1).

Tab. 1: *Receptory exprimované na lidských NK buňkách*

	Receptor	Ligand	Funkce
Aktivační receptory	CD16	Fc (IgG)	ADCC receptor
	NKp46	Virový HA, HSPG	Receptory přirozené cytotoxicity (natural cytotoxicity receptors, NCR)
	NKp44	Virový HA	
	NKp30	BAT-3, HSPG, B7-H6	
	KIR-S	HLA-C, B	Receptory pro HLA I či příbuzné molekuly
	CD94/NKG2C	HLA-E	
	CD94/NKG2E	HLA-E	
	NKG2D	ULBPs, MICA, MICB	
	CD160	HLA-C	
	CD244(2B4)	CD48	CD2 rodina
	CD2	CD48, CD58	
	NTB-A	NTB-A	
	CS1	CS1	
	DNAM-1 (CD226)	CD112, CD155	Receptory pro nektiny či nektinu podobné molekuly
	CD96	CD155	
Inhibiční receptory	CD95	C8, C9	
	KIR-L	HLA-C, B a A	Tolerance vlastních buněk
	ILT	HLA I. třídy	
	CD94/NKG2A	HLA-E	
	CD94/NKG2B	HLA-E	
	SIGLEC7, 9	Kyselina sialová	

Poznámky:

BAT-3 – HLA-B asociovaný transkript 3, HA – hemaglutinin, HSPG – heparansulfát proteoglykany, ULBPs – UL16 vazebné proteiny, MIC – MHC tř. I polypeptidu příbuzná sekvence, NTB-A – NK-T-B antigen, DNAM-1– DNAX přidatné molekuly, ILT – imunoglobulin-like transkripty
(upraveno podle Lee, Kang a Cho, 2017)

Intracelulární signalizace jak aktivačními, tak inhibičními receptory je založena na jejich nekovalentní asociaci s intracytoplazmatickými motivy tyrosinu (*immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs*, *ITIMs*) v případě inhibičních receptorů, stejně jako s transmembránovými adaptorovými DAP-12 molekulami s ITAM motivem (*immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs*) v případě aktivačních receptorů (Lee, Kang a Cho, 2017).

2.3.1 HLA specifické inhibiční receptory

Receptory interagující s MHC I. třídy, resp. HLA I. třídy ligandy jsou tzv. inhibiční. Tento typ inhibičních receptorů brání NK buňkám zaútočit proti vlastním buňkám s normálními antigeny MHC I. třídy, zatímco buňky s pozměněnými či chybějícími MHC I. třídy antigeny jsou díky těmto receptorům rozpoznány jako škodlivé a určené k cytolyze NK buňkami (Thielens, Vivier, Romagné, 2012).

U člověka lze nalézt dva hlavní typy inhibičních receptorů vážících se s HLA I. třídy. Jsou to inhibiční KIR receptory imunoglobulinové povahy specifické pro epitopy sdílené skupinami HLA-A, HLA-B a HLA-C antigenů klasické skupiny MHC tř. I. Dále se jedná o CD94/NKG2A receptory, heterodimerní struktury příbuzné C-lektinům. Ty rozeznávají HLA-E patřící do MHC I „neklasické“ skupiny, jež prezentují ve vedoucí sekvenci peptidy klasických molekul MHC I. třídy (Sullivan et al., 2008).

Oba typy receptorů vykazují inhibiční motivy imunoreceptorů založených na tyrosinu (ITIMs); ITIMs jsou tyrosin-fosforylovány při zesíťování a rekrutují tyrosin-fosfatázy, které defosforylují aktivační adaptorové molekuly a ukončují aktivaci NK buněk (Thielens, Vivier a Romagné, 2012).

Buňky, které neexprimují inhibiční receptory, zůstávají anergní a nereagují na zdravé autologní buňky (Falco et al., 2019).

2.3.2 HLA nespecifické aktivační receptory

Vedle HLA specifických receptorů exprimují NK buňky jinou důležitou sadu receptorů a koreceptorů, které hrají centrální roli při aktivaci NK buněk po interakci se specifickými ligandy na cílových buňkách, které se na vlastních zdravých buňkách vyskytují zřídka. Hlavní NK-aktivační receptory, které se podílejí na indukci rozpoznávání a usmrcování rakovinových buněk, jsou reprezentovány receptory přirozené cytotoxicity NCR (zahrnujícími NKp46, NKp44 a NKp30), NKG2D (CD314), DNAM-1 (CD226), 2B4 (CD244) a CD16. Zatímco NKp46 a NKp30 jsou přítomny i na neaktivovaných NK buňkách a udržovány po aktivaci, exprese NKp44 je omezena na aktivované NK buňky (Thielens, Vivier a Romagné, 2012; Falco et al., 2019).

Obecně jsou ligandy těchto receptorů zmnožovány či de novo exprimovány na stresovaných buňkách. NKp30 receptor rozeznává B7-H6 ligandy, NKp44 interaguje s MLL5 ligandem. Pro NKp46, jenž je hlavním zabijčem leukemických blastů, nebyl zatím žádný membránově vázaný lymfocytární ligand objeven (Falco et al., 2019).

NKG2D receptor se specificky váže na MICA/B a ULBP a DNAM-1 je specificky vázán s PVR (polio virus receptorem) a nektinem-2, jež jsou složkami buněčných spojení (Bauer et al., 1999; Pende et al., 2005). CD16 zprostředkovává protilátkově závislou cytotoxicitu NK buněk.

Funkce těchto hlavních aktivačních receptorů může být amplifikována receptory rodiny SLAM (receptory pro morbillivirus), silnou agonistickou roli hrají také interakce toll-like receptorů (TLR) se svými ligandy (Sivori et al., 2010; Claus et al., 2018).

Konečná aktivace NK buněk je řízena kvantitativní rovnováhou mezi aktivačními a inhibičními signály (Thielens, Vivier a Romagné, 2012).

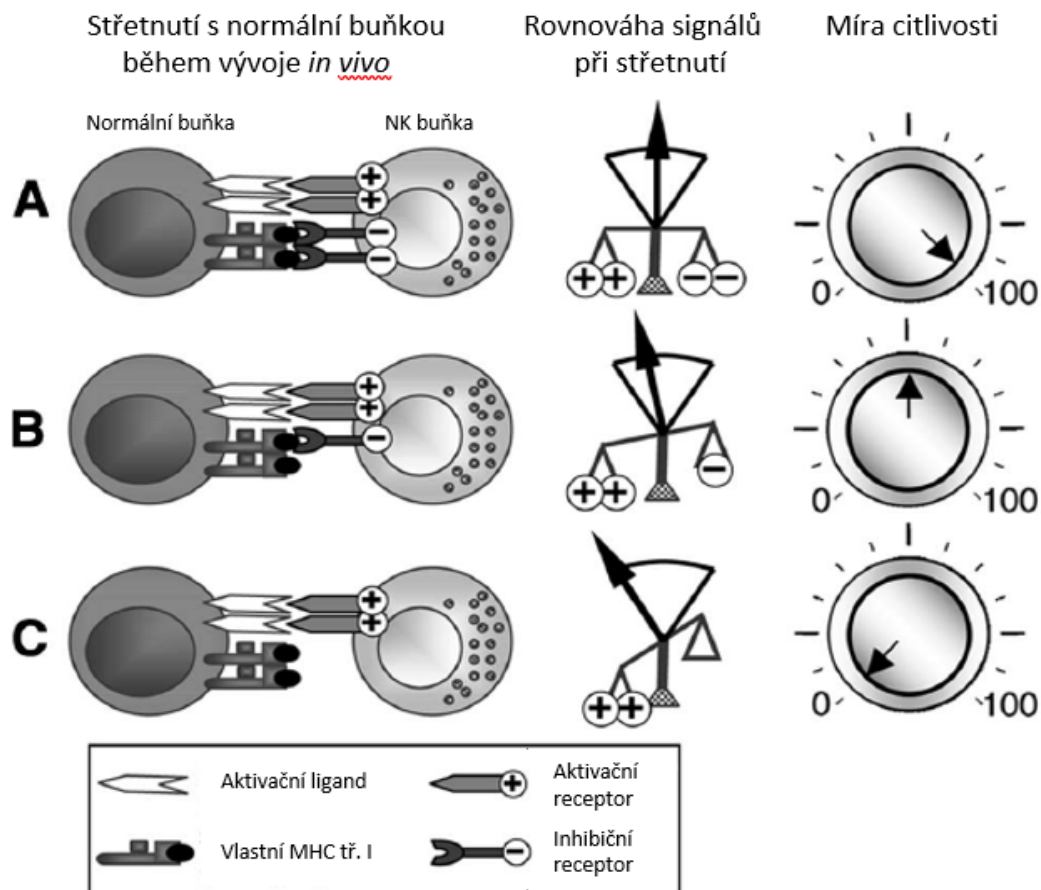
2.4 Edukace a tolerance NK buněk

Mechanismem regulujícím reaktivitu NK buněk je exprese pouze malého množství ligandů aktivačních NK receptorů na zdravých buňkách tak, aby nedocházelo k autoreaktivitě (Thielens et al., 2012; Orr, Lanier, 2010). Dále je reaktivita, resp. tolerance, regulována pomocí edukace NK buněk (Thielens et al., 2012).

Edukaci NK buněk, tj. učení se reagovat na buňky postrádající vlastní MHC I ligandy, zajišťují inhibiční receptory během vývoje v kostní dřeni. Vznik různé míry tolerance vysvětluje několik hypotéz. První z nich předpokládá, že všechny NK buňky jsou zprvu necitlivé a teprve kontakt s MHC I antigenem je aktivuje na kompetentní efektorové buňky (Kim et al., 2005). Další hypotéza naopak popisuje NK buňky jako primárně citlivé, které pokud nejsou osazeny inhibičními receptory, chronickou stimulací normálními buňkami se stávají nereaktivními (Gasser a Raulet, 2006).

Nejnovější hypotézou mechanismu edukace buněk je tzv. reostat model (obr. 2). Inhibiční (hlodavčí Ly49 nebo lidské KIR) receptory zralé NK buňky interagují s MHC I antigeny vlastních buněk a ustanovuje se jejich reaktivita prostřednictvím regulace množství inhibičních a aktivačních receptorů exprimovaných na NK buňce. Roli hraje také afinita inhibičních receptorů k vlastním MHC I. Buňky s více inhibičními receptory, které se za vývoje střetly s vlastním MHC I antigenem, budou reagovat citlivěji v případě missing self interakce než buňky s jedním nebo žádným inhibičním receptorem (Joncker et al., 2009).

Obr. 2: *Ladění reakce NK buněk: Reostat model*



Poznámky:

Během vývoje jsou NK buňky vystaveny inhibičním a stimulačním interakcím s normálními buňkami (levý sloupec). Rovnováha signálů při setkávání s normálními buňkami (střední sloupec) ustavuje stav citlivosti NK buněk (pravý sloupec). A – Stimulační signály z normálních buněk jsou potlačeny signály inhibičními, když je na vyvíjející se NK buňce koexprimováno několik inhibičních receptorů, což jí umožňuje dosáhnout stavu vysoké citlivosti. B – Exprese jednoho receptoru pouze částečně odvrací stimulační signály, takže reziduální perzistentní stimulace indukuje částečnou hyporeaktivitu. C – Pokud nejsou exprimovány žádné inhibiční receptory, silná trvalá stimulace vyvolává větší hyporeaktivitu. Reakce NK buněk je tedy laděny na kvantitativně odlišné hladiny citlivosti množstvím inhibičních a stimulačních interakcí, kterým jsou buňky vystaveny během vývoje. (*upraveno podle Joncker et al., 2009*)

Kapitola 3

KIR receptory

3.1 KIR geny

Genový komplex kódující KIR receptory se nachází na chromozomu 19q13.4 v komplexu leukocytového receptoru (*leukocyte receptor complex, LRC*, obr. 3). Na populační úrovni je tento komplex velmi různorodý, se značnou variabilitou v genetickém obsahu KIR haplotypů, stejně jako se vyznačuje významným polymorfismem v rámci jednotlivých KIR genů (Wende et al., 1999; Trowsdale, 2001).

Doposud bylo objeveno 17 KIR genů – devět inhibičních genů (2DL1/L2/L3/L4/L5A/L5B, 3DL1/L2/L3), šest aktivačních genů (2DS1/S2/S3/S4/S5, 3DS1) a dva pseudogeny (2DP1, 3DP1) – rozdělených dle haplotypu do skupiny A (KIR A) a skupiny B (KIR B). Avšak počet těchto genů v rámci populace je variabilní a stejně tak alely těchto genů jsou vysoce polymorfní (Trowsdale, 2001). Alelická diverzita je generována bodovou mutací a/nebo homologní rekombinací, ale relativní příspěvek těchto dvou mechanismů se liší mezi jednotlivými KIR geny. Alelický polymorfismus byl popsán pro všechny KIR geny kódující aktivační receptory i inhibiční specifické receptory pro HLA tř. I a nejrozsáhlejší je pro KIR3DL1, KIR3DL2 a KIR3DL3 (Kwon et al., 2000; Gardiner et al., 2001; EBI, 2019a⁴). K listopadu 2018 bylo otypizováno 977 alel všech KIR genů celkem na 1224 buňkách (EBI, 2019c⁵).

⁴ Dostupné z <https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/introduction.html>

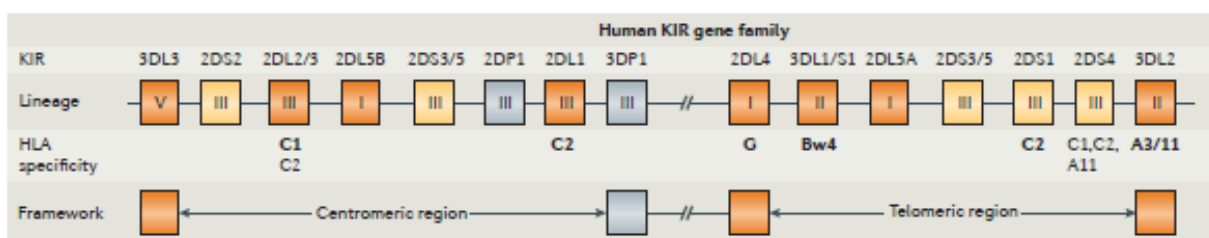
⁵ Dostupné z: <https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/stats.html>

KIR geny jsou kódovány v rozsahu 150 Kb 1M v oblasti dlouhého LRC na chromozomu 19. Rozšířený LRC také obsahuje geny kódující DAP adaptérové proteiny, CD66 antigeny, stejně jako SIGLEC, FcGRT, LILR, LAIR, FcAlphaR a NCR1 receptory. Prototypová skupina KIR je zobrazena v pravé části obrázku – modré rámečky označují rámcové (*framework*) geny, fialové jsou pseudogeny, červené rámečky označují inhibiční KIR a zelené rámečky představují geny aktivačních KIR. (*převzato z EBI, 2019b*)

Lidské KIR geny jsou distribuovány do centromerické a telomerické oblasti KIR lokusu na chromozomu 19. Obě oblasti jsou tvořeny odlišnými geny (Parham a Moffett, 2013; obr. 4). Podle toho, které geny se vyskytují v každé z oblastí, je možné KIR genotypy rozdělit do dvou širokých haplotypů A a B. Oba haplotypy sice vykazují variabilitu v počtu i typu KIR genů, ale obsahují čtyři rámcové geny, které jsou, až na výjimečné případy, přítomné u každého člověka. KIR genový shluk (*cluster*) je ohraničen KIR3DL3 na centromerickém konci, KIR3DL2 na konci telomerické oblasti a KIR3DP1 a KIR2DL4 uprostřed (Martin et al., 2000; Vilches a Parham, 2002) (viz obr. 4). Tyto čtyři rámcové geny vymezují dvě variabilní oblasti, kde jsou umístěny zbývající KIR geny (Hsu et al., 2002).

11

Obr. 4: *Pořadí KIR genů v KIR lokusu*

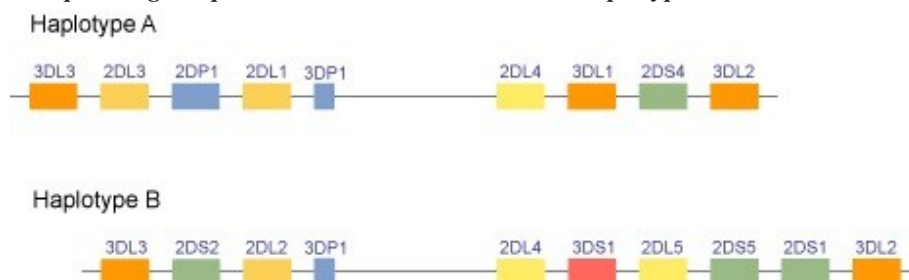


Poznámky:

Horní lineární diagram ukazuje pořadí lidských KIR genů v lokusu KIR na lidském chromozomu 19 a fylogenetické linie, ke kterým patří (linie KIR I, II, III nebo V). Pod genovými poli jsou zobrazeny epitopové specificity HLA třídy I kódovaných receptorů. Netučný typ označuje receptor, který rozpoznává pouze některé alotypy HLA nesoucí tento epitop. Rámečky pro geny kódující inhibiční receptory jsou vybarveny oranžově, rámečky pro geny kódující aktivační receptory jsou vybarveny béžově a rámečky odpovídající pseudogenům jsou vybarveny šedě. Spodní lineární diagram ukazuje rámcové geny a centromerické a telomerní oblasti variability genového obsahu, které lemují a definují. (převzato z Parham a Moffett, 2013)

Haplotypy skupiny A jsou ve své genové organizaci obecně málo variabilní, zahrnují všechny čtyři rámcové geny a dále také KIR2DL1, KIR2DL3, KIR3DL1, KIR2DS4 a KIR2DP1. Haplotypy skupiny B vykazují mnohem větší variabilitu v kombinacích genů KIR a jsou charakterizovány přítomností jednoho nebo více genů KIR2DL2, KIR2DL5A/B, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3/KIR2DS5 a KIR3DS1 (Marsh et al., 2003; Martin et al., 2004; obr. 5).

Obr. 5: *Příklad pořadí genů plně osekvenovaného KIR haplotypu A a B*



Poznámky:

Geny jsou uspořádány v pořadí od centromerické oblasti směrem k telomerické. Každý gen je 10-16 kb dlouhý a oddělený od dalšího sekvencí o délce okolo 2 kb, krom unikátní sekvence sousedící s 2DL4 směrem k centromere chromozomu, která je 14 kb dlouhá. (převzato z Carrington a Norman, 2003)

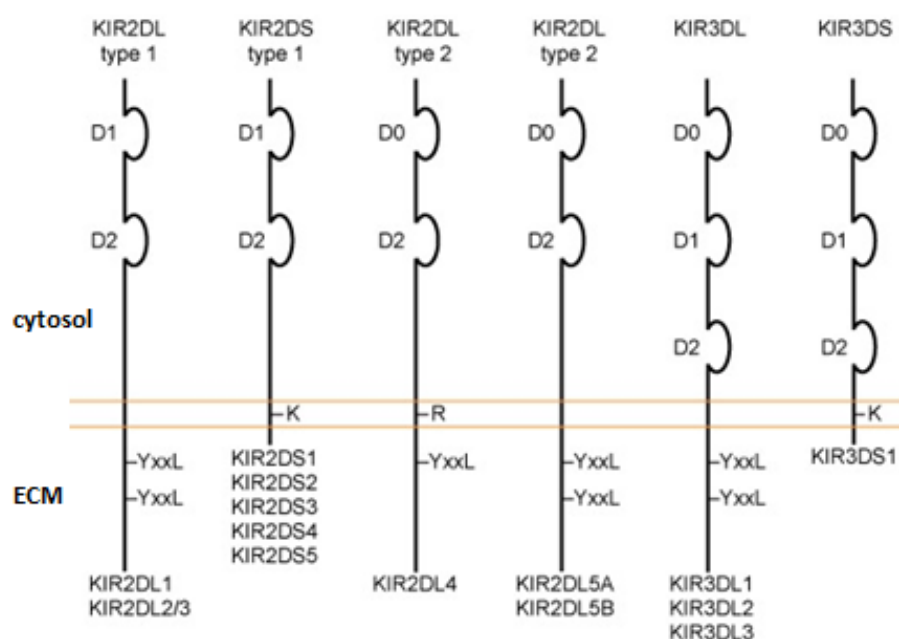
Haplotypy skupiny B jsou mnohem více variabilní i v počtu přítomných genů. Jsou tvořeny jedním až pěti aktivačními KIR (tj. KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS5 a KIR3DS1) a mohou inkorporovat inhibiční KIR geny, o kterých je známo, že chybí v haplotypech skupiny A (tj. KIR2DL2 a KIR2DL5), (Uhrberg, Parham a Wernet, 2002). Pomocí techniky genotypizace KIR používané v analýze segregace genů v rámci rodin bylo definováno více než 40 odlišných haplotypů skupiny B (Gómez – Lozano et al., 2002; Uhrberg, Parham a Wernet, 2002; Hsu et al., 2002; Khakoo a Carrington, 2006). Seznam všech dosud osekvenovaných KIR haplotypů lze nalézt na webové stránce Evropského institutu bioinformatiky, který je součástí Evropské laboratoře molekulární biologie (EBI, 2019⁷).

⁷ Dostupné z: https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/sequenced_haplotypes.html

3.1.2 Organizace KIR genů a struktura jejich proteinových produktů

Celková délka KIR genů se pohybuje mezi 4 a 16 Kb a obsahuje 4 až 9 exonů. KIR geny jsou děleny do tří skupin podle jimi kódované struktury proteinových molekul. Jsou to KIR2D geny typu I, které kódují dvě extracelulární imunoglobulinové domény s konformacemi D1 a D2. Dále jsou to strukturně odlišné KIR2D geny typu II kódující extracelulární proteinové domény s konformacemi D0 a D2 a třetí skupinou jsou KIR3D geny s třemi doménami D0, D1 a D2 (Vilches a Parham, 2002; obrázek 6).

Obr. 6: *Struktura domén KIR receptorů*



Poznámky:

KIR geny jsou členy Ig-nadrodiny a exprimují molekuly buď se dvěma nebo třemi extracelulárními doménami podobnými Ig. Cytoplazmatické domény inhibičních receptorů obsahují sekvence ITIM (I/ VxYxxL/ V). ECM – extracelulární matrix, (upraveno podle Carrington a Norman, 2003)

Geny KIR2D typu I, které zahrnují pseudogen KIR2DP1 stejně jako geny KIR2DL1-3 a KIR2DS1-5, mají osm exonů a taktéž obsahují sekвени pseudoexonu 3. Tento pseudoexon je v typu I KIR2D inaktivován (Colonna a Samaridis, 1995; Wagtmann et al., 1995; EBI, 2019a).

Geny KIR2D typu II zahrnují KIR2DL4 a KIR2DL5 a je pro ně charakteristická delece oblasti odpovídající exonu 4 ve všech KIR. Kromě toho se geny KIR2D typu II liší od genů KIR2D typu I tím, že mají translatovaný exon 3, zatímco geny KIR2D typu I mají na stejném místě netranslatovanou sekвени pseudoexonu 3 (viz výše), (Selvakumar, Steffens a Dupont, 1996; Vilches et al., 2000).

Geny KIR3D mají devět exonů a zahrnují strukturně příbuzné geny KIR3DL1, KIR3DS1, KIR3DL2 a KIR3DL3. Nukleotidové sekвени KIR3DL2 jsou nejdelší ze všech genů KIR. Ve skupině KIR3D se všechny čtyři KIR geny liší v délce exonu 9, oblasti kódující cytoplazmatický ocásek (Colonna a Samaridis, 1995; Torkar et al., 1998; Döhring, Samaridis a Collona, 1996).

Nezávisle na počtu extracelulárních domén se struktura KIR receptorů liší také délkou intracytoplasmatických domén. Domény jsou buď krátké (označované jako „S“-*short*) nebo dlouhé (označované jako „L“-*long*). KIRy s dlouhými doménami mají inhibiční funkci, protože obsahují 2 ITIM motivy tvořené sekvencí aminokyselin I/VxYxxL/V (obr. 6).

Výjimkou je KIR2DL4, který obsahuje pouze jeden N-terminální ITIM. Kromě toho KIR2DL4 také obsahuje nabitý zbytek (arginin, R) ve své transmembránové doméně, což je znak, který umožňuje, aby tento receptor vyvolával jak inhibiční, tak aktivační signály (Maxwell et al., 2002). Krátké domény KIRů zajišťují aktivační funkce interakcí s adaptorovou molekulou DAP-12, která obsahuje ITAM aktivační motivy (Olcese et al., 1997; Lanier et al., 1998).

3.2 Inhibiční KIR receptory a jejich ligandy

Inhibiční receptory NK buněk jsou hlavními zprostředkovateli a regulátory funkce NK buněk. Úloha inhibičních KIRů (iKIR) v aloreaktivitě přirozeně zabíječských buněk byla rozsáhle popsána a klinicky dokázána (Ruggeri et al., 2007). Obecně, prostřednictvím iKIR jsou NK buňky edukovány a interagují s MHC I. tř. ligandy (Anfossi et al., 2006). Následná nepřítomnost těchto ligandů, jako i chybné párování s MHC I. třídy, způsobuje disinhibici NK buňky a umožňuje tak aktivaci a případnou cytotoxicitu (Shah, 2015).

Inhibiční členové Ig rodiny receptorů NK buněk zahrnují KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DL4, KIR3DL1, KIR3DL2 a KIR3DL3. Tyto receptory selektivně rozpoznávají alelické varianty HLA tř. I. KIR3DL2 rozpoznává HLA-A3 a HLA-A11, KIR3DL1 rozpoznává určité HLA-B alotypy (Bw4+) a molekuly KIR2DL1-3 rozpoznávají alotypy HLA-C (Parham, 2005). KIR2DL4 receptor se váže na HLA-G z neklasické MHC I. tř. skupiny antigenů. Ligandy receptorů KIR2DL5 a KIR3DL3 jsou prozatím neznámé (Carrillo-Bustamante, Keşmir a De Boer, 2016).

HLA-C specificita pro členy KIR2DL je do značné míry určena aminokyselinou v poloze 80 daného genu. HLA-C alotypy skupiny 1 (HLA-C1) mají v poloze 80 asparaginový zbytek, což umožňuje rozpoznání KIR2DL2 a KIR2DL3 receptory, zatímco alotypy skupiny 2 HLA-C (HLA-C2), s pozicí lysinu v témže místě, jsou rozpoznávány pomocí KIR2DL1 (Boyington a Sun, 2002, EBI 2019d⁸). Různorodá exprese těchto receptorů v populaci NK buněk vede pravděpodobně ke specifickému repertoáru HLA antigenů každého člověka (Raulet, Vance a McMahon, 2001).

U lidí jsou epitopy A3/11 a Bw4 nesené menšinovou podskupinou alotypů HLA-A a HLA-B. Naopak, všechny alotypy HLA-C mají buď epitop C1 nebo C2 (Parham a Moffett, 2013). Výsledkem je, že pouze okolo 50% lidské populace má Bw4 a/nebo A3/11, zatímco 100 % lidí má vždy C1 a/nebo C2. Díky tomuto poměru jsou HLA-C antigeny považovány za dominantní zdroj ligandů pro lidské inhibiční KIR. Mnohé studie se shodují v tom, že MHC-C vznikly při přirozeném výběru u vyšších

⁸ Dostupné z: <https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/ligand.html>

primátů jakožto specializovanější ligandy pro KIR než HLA-A nebo HLA-B (Aguilar Older et al. 2010).

3.3 Aktivační KIR receptory a jejich ligandy

Aktivační KIR receptory obecně mají krátké cytoplasmatické domény, postrádají ITIM motivy a v transmembránové oblasti nesou pozitivně nabitý kyselinový zbytek lysinu či argininu, který umožňuje interakci s DAP-12, což jsou molekuly zodpovědné za aktivační signalizaci. Jedná se o KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4, KIR2DS5, a KIR3DS1 receptory, jejichž ligandy jsou intenzivně zkoumány zejména v posledním desetiletí (Falco et al., 2019).

Z evolučního hlediska vznikly pravděpodobně aktivační KIR receptory z homologních genů pro inhibiční KIR (Abi-Rached a Parham, 2005). Velká variabilita frekvence aktivačních KIR genů byla objevena napříč různými populacemi (Single et al., 2007), navíc alelický polymorfismus aktivačních KIR je mnohem častější než polymorfismus inhibičních genů, který je poměrně limitován (Hou et al., 2008).

Co se týká imunitní funkce a kontroly nemocných buněk, aktivační KIR geny na rozdíl od těch inhibičních stále nejsou dostatečně prozkoumány. Přestože jsou strukturními a vývojovými homology inhibičních KIR, signalizují skrze vnitrobuněčné adaptorové proteiny (Stewart et al., 2005). Velmi málo studií prokázalo vazbu aktivačních KIR s HLA tř. I, jak je to typické pro inhibiční KIR. Jedinou doposud ověřenou interakcí je vazba KIR2DS1 a HLA-C2 ligandu (s jeho N77/K80 motivem) vzhledem k tomu, že se jedná o blízký homolog inhibičního KIR2DL1 (Moretta et al., 1995). Tato vazba KIR2DS1 je však ve srovnání s vazbou KIR2DL1 velmi slabá, a tak je její klinický význam sporný (Stewart et al., 2005).

Některými studiemi bylo prokázáno, že KIR2DS2 rozpoznává HLA-C1 a indukuje aktivaci NK buněk závislou na KIR-HLA interakci (David et al, 2013; Stewart et al., 2005). Nicméně, mnoho jiných studií nedokázalo interakce KIR2DS2 s HLA-C1 identifikovat (Moesta a Parham, 2012). Nedávný výzkum z roku 2014 skupiny J. Liu odhalil, že KIR2DS2 rozpoznává HLA-A*11.

Ukázalo se také, že KIR2DS4, který je produktem genové konverze KIR3DL2, interaguje s HLA-A*11:02, HLA-C*05:01 a HLA-C*16:01 alelami (Graef et al., 2009).

Na rozdíl od výše uvedených aktivačních KIR, KIR2DS3 a KIR2DS5 nemají žádné inhibiční protějšky a identifikace jejich příslušných ligandů zatím nebyla úspěšná. Není objasněn ani mechanismus interakce aktivačních KIR receptorů s inhibičními v procesu edukace NK buněk (Shah, 2015). Tabulka 2 shrnuje všechny aktivační a inhibiční KIR receptory (viz následující kapitola) a jejich ligandy.

Tab. 2: *Ligandy aktivačních a inhibičních KIR receptorů*

	KIR receptor	Ligand
Aktivační KIR receptory	2DS1	HLA-C2
	2DS2	HLA-C1, HLA-A*11:01
	2DS3	neznámý
	2DS4	HLA-C*05:01, A*11:02, C*16:01
	2DS5	neznámý
Inhibiční KIR receptory	3DS1	neznámý
	2DL1	HLA-C2
	2DL2 / 2DL3	HLA-C1, HLA-C2, HLA-B*46:01, a HLA-B*73:01 (C1 epitop)
	2DL4	HLA-G
	2DL5	neznámý
	3DL1	HLA-A s Bw4 motivem, HLA-Bw4
	3DL2	HLA-A3/A11
	3DL3	neznámý

Poznámky:

Vlastní zpracování, (upraveno dle Carrillo-Bustamante, Keşmir a De Boer, 2016)

Kapitola 4

Uplatnění KIR receptorů v HSCT u leukemií

4.1 Alogenní transplantace hematopoetických kmenových buněk

Ač doklady prvních pokusů o transplantaci kostní dřeně lze nalézt již v záznamech z dob před naším letopočtem, první alogenní (tj. od geneticky odlišného jedince) transplantace hematopoetických kmenových buněk (hematopoietic stem cell transplantation, HSCT) v moderní medicíně je datována do 50. let 20. století, kdy byla použita E. Donnalllem Thomasem v 1957 pro oběti silné chemoterapie a ozáření (Thomas et al., 1957). V tomto období byl objeven první HLA antigen (Dausset, 1958) a o několik let později (1963) již byla provedena první úspěšná transplantace s přežitím pacienta po dobu delší než jeden rok (Mathe, 1967).

K největšímu pokroku v transplantacích u akutních leukemií došlo v 70. letech. V roce 1972 byl založen Mezinárodní registr pro transplantace kostní dřeně, který dnes spadá pod Výzkumné centrum pro transplantace krve a kostní dřeně a čítá okolo půl milionů pacientů (CIBMTR⁹, 2009). Od té doby se tento transplantologický obor vyvinul a rozšířil po celém světě. Nové indikace k HSCT vedle akutní leukémie a aplastické anémie jsou neustále zkoumány a nyní zahrnují i vrozené poruchy hematopoetického systému, metabolické poruchy a různá autoimunitní onemocnění. Alogenní transplantace je nadějí také pro pacienty nakažené virem HIV (Gupta et al., 2019). Použití odpovídajících nepříbuzných dárců, jednotek pupečnickové krve a částečně příbuzných dárců dramaticky rozšířilo dostupnost alogenní transplantace (Henig a Zuckerman, 2014).

4.2 Úloha NK buněk v alogenní transplantaci u leukemií

4.2.1 Transplantace HSC u pacientů s leukemií

U pacientů s akutní vysoce rizikovou (tzv. *high-risk*) leukemií je HSCT mnohdy jedinou život zachraňující léčbou. HLA identičtí sourozenci nebo nepříbuzní HLA 10/10 shodní dárce jsou první volbou pro transplantaci. Nicméně šance, že sourozenec bude HLA identický, je 25 % a pouze

⁹ Dostupné z: <https://www.cibmtr.org/Meetings/Materials/CRPDMC/Pages/feb09barrett.aspx>

přibližně 2 ze 3 pacientů najdou HLA kompatibilního nepříbuzného dárce. Tento podíl může být ještě nižší u pacientů určitých etnických skupin (např. romská či vietnamská komunita v Česku). Je-li HLA shodný dárce nedostupný nebo je pacient v naléhavé potřebě HSCT (např. v případě vysokého rizika relapsu), vhodnou alternativou je nepříbuzný HLA neshodný (9/10 znaků shodných) či haploidentický dárce (shodný s pacientem pouze v polovině vyšetřovaných HLA znaků).

Haploidentická HSCT (haplo-HSCT) se stala možnou alternativou léčby leukémií v 90. letech 20. století především díky zintenzivnění léčebného režimu použitím rozsáhlé ex vivo deplece T-buněk, aby se zabránilo odmítnutí štěpu a předešlo se GvHD, a také díky podávání velkého množství kmenových CD34^{pos} buněk ve štěpu (Aversa et al., 1994; Martelli a Aversa, 2016). Od roku 2010 se využívá štěpů se selektivní deplecí α/β T buněk a B buněk a s obsahem zralých dárcovských NK buněk a γ/δ T buněk spolu s kmenovými buňkami, aby se co nejvíce urychlila reakce NK buněk proti nádorovým blastům (Locatelli et al., 2017; Bertaina et al., 2018). Přihojení štěpu po haploidentické transplantaci pak závisí především na NK buňkách, které představují první populaci lymfocytů rekonstituujících pacientovu kostní dřeň (Ruggeri et al., 2002; Ruggeri et al., 2007; Pende et al., 2009). Příznivější klinické výsledky jsou spojeny s NK aloreaktivitou (přítomností neshody KIR-ligand v GvH smyslu) (Ruggeri et al., 2002; Falco et al., 2019).

V současnosti je hojně využíván také ex vivo nemanipulovaný, tj. T-nedepletovaný haploidentický štěp, což je umožněno posttransplantačním podáním vysoce dávkovaného cyclofosfamidů (CY). Toto alkylační cytostatikum je profylaxí proti GvHD a odhojení transplantátu díky schopnosti in vivo potlačit aloreaktivní dárcovské i příjemcovy T buňky (Martelli a Aversa, 2016). Nižší GvHD po haploidentické transplantaci s posttransplantačním CY ve srovnání s HLA-neshodným dárcovským transplantátem a též srovnatelné celkové přežití po haploidentické transplantaci jako po transplantaci od shodných URDs pro AML bylo dokázáno výzkumem S. Ciurey et al. v roce 2015.

Na druhou stranu, velká retrospektivní studie S. Piemontese et al. publikovaná v roce 2017 srovnávala výsledky nemanipulovaných haploidentických a nepříbuzenských (*unrelated donor, URD*) transplantací u více než 3500 pacientů s akutní lymfoblastickou či myeloidní leukémií. Dlouhodobé přežití a přežití bez známek nemoci bylo signifikantně vyšší u URD transplantací s plnou shodou v HLA znacích než u haploidentických a HLA-neshodných nepříbuzenských transplantací, kde se výsledky téměř nelišily (Piemontese et al., 2017). Tyto i další výzkumy naznačují, že nejvhodnější volbou léčby stále zůstává nepříbuzenská transplantace od HLA shodného dárce, ale haploidentické transplantace jsou v případě nutnosti nejvhodnější a srovnatelnou variantou léčby.

4.2.2 Aloreaktivita NK buněk při HSCT

Kromě dárcovských T buněk jsou to tedy přirozeně zabíjecké NK buňky, jejichž úloha je nezastupitelná v prevenci relapsu (GvL efekt) a GvHD po alogenní transplantaci hematopoetických kmenových buněk díky schopnosti eradikovat leukemické blasty a eliminaci zbytkových recipientních dendritických buněk a T lymfocytů.

Silná NK aloreaktivita byla popsána po haploidentické HSCT s deplecí T-buněk (viz výše) a tyto účinky byly připsány receptorům KIR. Mnohé studie a zprávy naznačují významnou roli KIR nejen ve výsledku haploidentických HSCT, ale také v případě transplantací od nepříbuzných dárců (Heidenreich a Kröger, 2017).

Mnohé znalosti o aloreaktivitě zprostředkované NK buňkami byly shromážděny především v důsledku zavedení haploidentické HSCT. Ruggeri et al. (1999) jako první prokázal aloreaktivitu zprostředkovanou NK buňkami v haploidentickém štěpu zbaveném T buněk. Usnadněné přihojení štěpu, stejně jako lýza nádorových buněk NK buňkami, byly pozorovány u dárcovských štěpů, které byly KIR-ligand inkompatibilní ve smyslu štěp versus hostitel a bez výskytu GVHD. Od té doby mnoho dalších vědeckých skupin zkoumalo příznivý účinek aloreaktivních NK buněk v haploidentické HSCT a zdokonalila se kritéria pro volbu potenciálního dárce (Ruggeri et al., 2016). Výsledky jsou slibné především pro akutní myeloidní leukemii (AML) (Ruggeri et al., 2007; Stringaris et al., 2010), zatímco u některých lymfoidních malignit bylo prokázáno, že jsou vůči účinkům NK buněk zprostředkovaným KIR rezistentní (Ruggeri et al., 2002; Stringaris et al., 2010), i když ne ve všech případech (Leung et al., 2004; Pende et al., 2009).

Po objevu prospěšnosti aloreaktivity NK buněk v haploidentické HSCT byla snaha o využití těchto poznatků také v transplantacích od HLA shodných nepříbuzných dárců. Protože HLA a KIR se dědí nezávisle na sobě, přibližně 75 % HLA-identických sourozeneckých dárců a téměř všichni odpovídající nepříbuzní dárce budou vykazovat KIR disparitu a mohli by tedy být zdrojem užitečných aloreaktivních NK buněk (Shilling et al., 2002; Heidenreich a Kröger, 2017).

Inkompatibilita KIRů a jejich ligandů v případě transplantací kmenových buněk od nepříbuzných dárců byla již mnohokrát zkoumána a pozorované výsledky byly odlišné, ne-li opačné než v případě haploidentických transplantací a nemohou být tedy uplatněny stejné poznatky v případě URDs (Davies et al., 2002). Štěpy pro haploidentickou HSCT zahrnují úpravu štěpu, a to převážně deplecí T-buněk s vysokým množstvím kmenových buněk, stejně jako použití slabé nebo žádné imunosuprese, což má za následek rychlou rekonstituci NK buněk, ale pomalou obnovu T-buněk a eradikaci antigen prezentujících buněk aloreaktivními NK klony (Aversa et al.; 1994, Aversa et al., 1998; Ruggeri et al., 2002). Imunologické prostředí v průběhu přihojování štěpu v haploidentické HSCT se proto výrazně liší od URD-HSCT a význam KIR-ligand neshody u URD transplantací zůstává zatím neobjasněn.

4.3 Úloha KIR receptorů v HSCT u akutní myeloidní leukemie

Mnohé transplantační protokoly založené na nesouladu, tzv. *mismatch*, KIR receptorů a jejich ligandů dokázaly pozitivní korelaci vztahu KIRů ke snížené míře relapsu nemoci, menší pravděpodobnosti vzniku GvHD a celkové vyšší šanci na přežití u pacientů s akutní myeloidní leukémií (Ruggeri et al., 1999).

V roce 2002 Ruggeri et al. byli první skupinou, která prokázala vysoce příznivý účinek neshody KIR a ligandu dárce a příjemce u akutní myeloidní leukémie. Pacienti s AML byli rozděleni podle párování KIR s HLA do dvou skupin a léčeni HLA-haploidentickou HSCT s deplecí T-buněk. U těch, u nichž došlo k neshodě v párování KIR a ligandu, byla míra relapsu 0 % po 5 letech ve srovnání s těmi, kteří byli transplantováni odpovídajícími dárce a kteří měli pravděpodobnost relapsu 75 % za stejné časové období (tab. 3).

Tab. 3: *Výsledky transplantací s a bez KIR-ligand inkompatibilit dárce a příjemce*

KIR ligand inkompatibilita	Ne	Ano
Počet transplantovaných	58	34
Dárce s aloreaktivními NK klony	1/58	34/34*
Onemocnění		
ALL	21	14
AML	37	20
Výsledky transplantace		
Rejekce štěpu	15,5 %	0 %*
Akutní GvHD	13,7 %	0 %*
Pravděpodobnost relapsu po 5 letech		
ALL	90 %	85 %
AML	75 %	0 %**

Poznámky: * P <0,01, ** P <0,0008
(upraveno podle Ruggeri et al., 2002).

V roce 2010 pak Cooley et al. prokázali příznivý léčebný účinek u HSC dárce, kteří mají motivy centromerického B KIR ligandu, z hlediska prevence relapsu po nepříbuzenských HSCT u pacientů s AML. Výzkum zahrnoval 1409 pacientů, kteří podstoupili myeloablativní, od T buněk depletovanou transplantaci od nepříbuzného dárce. 1086 pacientů mělo diagnózu AML, zbylých 323 mělo ALL.

Přibližně polovina párů donor-recipient (AML: 50 %, ALL: 46 %) byla shodná v 10 z 10 HLA alel a jedna polovina měla určitý HLA nesoulad. Dárce byli typizováni na přítomnost a nepřítomnost jednotlivých KIR genů. Z genotypů bylo stanoveno, zda byl dárce genotypu A/A nebo B/x. Pro donory B /x bylo dále vyšetřováno, zda jejich B haplotypové geny byly v centromerické nebo telomerní části KIR lokusu, případně v obou. Z těchto dat bylo vypočítáno skóre KIR B obsahu pro každého dárce, které udává celkový počet centromerických a telomerických motivů obsahujících geny B haplotypu (Cooley et al., 2010).

Na základě výsledků poté navrhla Cooleyho skupina algoritmus, který umožňuje výběr HSC dárce podle obsahu KIR genů. Skupina AML pacientů byla hodnocena z hlediska relapsu a bezpříznakového přežití (*disease free survival, DFS*). Na základě této analýzy byly skupiny dárce majících KIR B rozděleny takto:

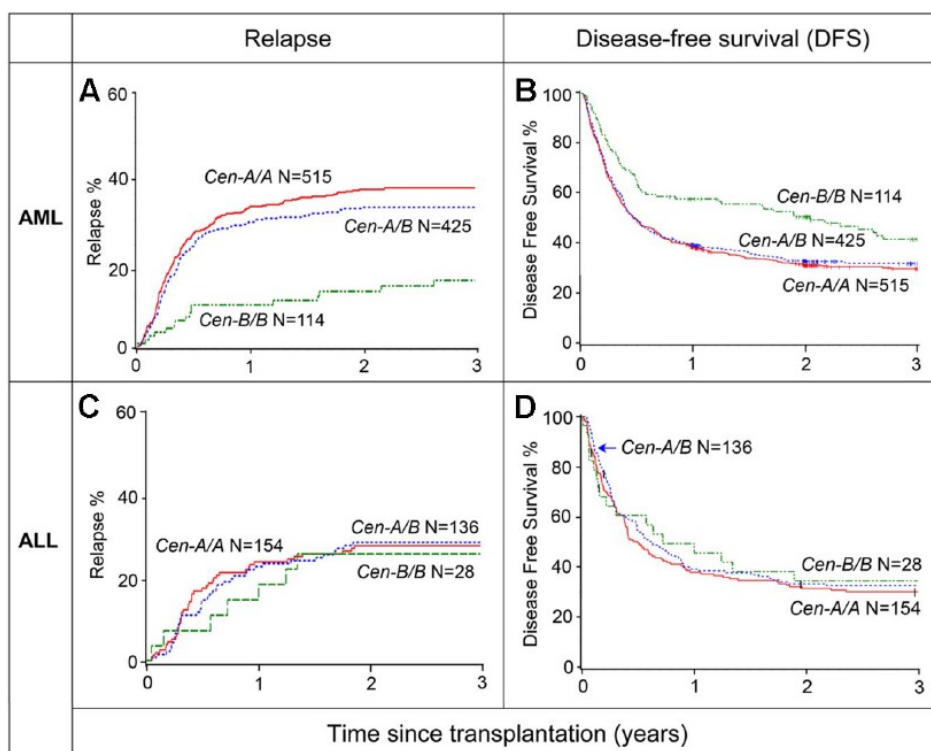
(1) „nejlepší“, kde skóre KIR B obsahu je větší než 2, KIR haplotyp je Cen¹⁰-B/B, Tel¹¹-x/x (definováno 2DL3 nepřítomností, přítomností 2DS2 a/nebo 2DL2);

(2) „lepší“ se skóre KIR B obsahu větší než 2 a haplotypem KIR Cen-A/x, Tel-B/x (definováno přítomností 2DL3, 2DS2 a/nebo 2DL2, 3DS1 a/nebo 2DS1 přítomností nebo přítomností 2DL3, 2DS2 a/nebo 2DL2 nepřítomností a přítomností 3DS1 a/nebo 2DS1);

(3) „neutrální“ s KIR B skóre 0 nebo 1 (definováno přítomností 2DL3, nepřítomností 2DS2 a/nebo 2DL2, přítomností 3DL1 a 2DS4).

U ALL pacientů na rozdíl od AML protektivní účinek B/x genotypu nebyl prokázán (Cooley et al., 2010; obr. 7).

Obr. 7: *Specifické snížení relapsu a zlepšení DFS u dárců s Cen-B/B po transplantaci pro AML, ale ne pro ALL.*



Poznámky:

Donorům byly přiřazeny genotypy Cen-A/A, Cen-A/B a Cen-B/B. Nahoře incidence relapsu (A) a pravděpodobnost DFS (B) pro AML pacienty. V dolní části je ukázána incidence relapsu (C) a pravděpodobnost DFS (D) pro ALL pacienty na základě genotypové skupiny dárců Cen. (převzato z Cooley et al., 2010)

Algoritmus je volně využitelný na webových stránkách Evropského institutu pro bioinformatiku a je využíván také při vyšetřeních KIR genotypu dárců a predikci léčby AML na Ústavu hematologie a krevní transfúze v Praze (EBI, 2019e¹²). Databáze obsahuje okolo 180 predikovaných genotypů, se kterými jsou srovnávány genotypy dárců (je možno zadat až pět dárců pro jednoho konkrétního

¹⁰ Cen- zkratka pro centromerickou oblast KIR lokusu

¹¹ Tel- zkratka pro telomerickou oblast KIR lokusu

¹² Dostupné z: https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/donor_b_content.html

pacienta). Typ genotypu dárce je vyhodnocen dle algoritmu jako nejlepší, lepší či neutrální vzhledem k prognóze úspěšnosti léčby. Typizace genotypu dárce se na Ústavu hematologie a krevní transfúze provádí pomocí PCR-SSP.

Je však třeba brát v potaz, že tento algoritmus má také svá omezení. Například nemůže spolehlivě předpovědět aloreaktivitu NK buněk ve všech případech, protože geny KIR jsou na alelické úrovni polymorfní, což algoritmus opomíjí.

Další rozsáhlý výzkum KIR receptorů, který může pomoci v léčbě akutní myeloidní leukémie, provedla skupina Jeanette E. Boudreau a publikovala ho v roce 2017. Vědci zde vycházeli z předpokladu, že alelická variabilita KIR mezi dárce má vliv na to, jak intenzivně jsou dárcovské NK buňky inhibovány HLA antigeny nádorových buněk, a tedy vede k rozdílům v leukemotoxicitě. Zkoumán byl KIR3DL1, jakožto velmi polymorfní receptor (147 známých alel KIR3DL1 genu k listopadu 2018; EBI, 2019c), a jeho ligand HLA-Bw4, u jejichž genů jednotlivé alelické varianty ovlivňují expresi ligandu i receptoru, vazebnou afinitu, edukaci NK buněk i inhibici (Carr, Pando a Parham, 2005; Yawata et al, 2016; Shaffer a Hsu, 2016). Navíc nedostatek HLA-Bw4 ligandů ve srovnání s jinými ligandy významně snižuje riziko relapsu leukemie a progresi solidních tumorů (Boudreau et al., 2017).

Alely KIR3DL1 mohou být podle hustoty exprese rozděleny do čtyř hlavních skupin:

- (1) vysoce exprimované alely KIR3DL1 (KIR3DL1-high), jako jsou * 001 a * 002,
- (2) slabě exprimované alely KIR3DL1-low, jako jsou alely * 005 a * 007,
- (3) alely KIR3DL1-null, jako např. * 004, které nejsou exprimovány na buněčném povrchu,
- (4) KIR3DS1, které neinteragují s HLA-Bw4 (Boudreau, Le Luduec a Hsu, 2014).

Zjistilo se, že skupiny KIR3DL1-high a KIR3DL1-low poskytují různě silný inhibiční signál, když se setkávají se specifickými alelami HLA-Bw. Například alely KIR3DL1-high interagující s HLA-Bw4 s isoleucinem v poloze 80 (HLA-Bw4-I80) poskytují vysoce inhibiční signál, ale po interakci s HLA-Bw4 s threoninem v poloze 80 (HLA-Bw4-T80) poskytují slabý inhibiční signál (Boureau et al., 2016). KIR3DL1-low receptory se vážou na oba subtypy HLA-Bw4 se stejnou měrou vysílaného inhibičního signálu. Typizace KIR3DL1 a HLA-Bw příjemce i dárce může tedy předpovědět stupeň inhibice dárcovských NK buněk.

U 1 328 pacientů s AML, kteří dostali HLA-kompatibilní alogenní štěpy, kombinace subtypu dárce-příjemce KIR3DL1/HLA-B vykazující slabou nebo žádnou inhibici in vitro byly spojeny s významně nižším relapsem a vyšším přežitím ve srovnání se silně inhibičními kombinacemi. Vzniká tak nové imunogenetické kritérium, podle kterého mohou být vybírání dárce kmenových buněk pro maximální úspěšnost léčby AML a lepší výsledek transplantace (Boudreau et al., 2017).

Kapitola 5

Závěr

Během několika posledních dekad se významně posunulo kupředu chápání NK buněk a jejich biologického významu. Na počáteční představy o NK buňkách jako prostých lymfocytech vrozené imunity navazují nové poznatky přes pečlivé ladění jejich funkce prostředím například k ovlivnění jejich schopností variabilní exprese MHC antigenů. Nyní se zkoumají také jejich paměťové a adaptivní rysy. Stále probíhá nespočet výzkumů s účelem zefektivnit prostřednictvím NK buněk léčebné procesy nejen u leukémií, ale i dalších nádorových i nenádorových onemocnění.

Pacienti s vysoce rizikovou leukémií potřebují často HSCT k přežití. Je možno využít několik typů transplantace podle dostupnosti léčby. Nejlepších výsledků je dosahováno při nepřibuzenských transplantacích od HLA shodných dárců, i když celkový vývoj v oblasti hematonekologie naznačuje, že rozdíly v úspěšnosti různých typů transplantací se s rozvojem léčebných metod a průběžnou úpravou léčebných protokolů postupně stírají. Význam aloreaktivity NK buněk byl poprvé prokázán u haploidické transplantace. NK buňky jsou schopné komunikace s nádorovými buňkami skrze své aktivační a inhibiční receptory. K aloreaktivě NK buňky a lýze transformované buňky dochází, pokud nenalezne na nádorové buňce svůj ligand. Tímto mechanismem dochází ke GvL reakci, která zajišťuje remisi onemocnění. Nejvýznamnějšími receptory v této reakci jsou aktivační a inhibiční KIR receptory, jejichž kooperací dochází k rozpoznávání vlastních, cizích, změněných či chybějících antigenů a spuštění příslušné reaktivity NK buňky.

Nejvýznamnější účinek KIR receptorů byl prokázán u diagnózy akutní myeloidní leukémie, kde byla jasně prokázána výhoda neshody KIR příjemce a ligandů dárce. Dále bylo prokázáno, že vysoký obsah KIR haplotypu B dárce významně zlepšuje prognózu léčby a šanci na přežití u pacientů s AML. KIR typizace se stala běžnou součástí předtransplantačních vyšetření u dárců HSC pro pacienty s AML a je využívána k odhadu úspěšnosti léčby. Dalším přínosným vyšetřením u AML je typizace polymorfních KIR3DL1 a HLA-B genů, neboť KIR3DL1 a jejich kombinace vykazují různou míru inhibice NK buněk. Nízká či žádná inhibice přitom výrazně zlepšuje výsledky léčby.

NK buňky a jejich KIR receptory tvoří velmi komplexní systém, který má velký potenciál v léčbě dalších leukemických onemocnění, předpokládán je jejich možný přínos také u ALL, i když výsledky pokusů jsou zatím velmi rozporuplné a vyžadují další výzkum.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ABI-RACHED, Laurent; PARHAM, Peter. Natural selection drives recurrent formation of activating killer cell immunoglobulin-like receptor and Ly49 from inhibitory homologues. *Journal of Experimental Medicine*, 2005, 201.8: 1319-1332.
- AGUILAR, Anastazia M. Older, et al. Coevolution of killer cell Ig-like receptors with HLA-C to become the major variable regulators of human NK cells. *The Journal of Immunology*, 2010, 185.7: 4238-4251.
- ANFOSSI, Nicolas, et al. Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity*, 2006, 25.2: 331-342.
- AVERSA, Franco, et al. Successful engraftment of T-cell-depleted haploidentical "three-loci" incompatible transplants in leukemia patients by addition of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood progenitor cells to bone marrow inoculum. *Blood*, 1994, 84.11: 3948-3955.
- AVERSA, Franco, et al. Treatment of high-risk acute leukemia with T-cell-depleted stem cells from related donors with one fully mismatched HLA haplotype. *New England Journal of Medicine*, 1998, 339.17: 1186-1193.
- BAUER, Stefan, et al. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science*, 1999, 285.5428: 727-729.
- BERTAINA, Alice, et al. Unrelated donor vs HLA-haploidentical α/β T-cell- and B-cell-depleted HSCT in children with acute leukemia. *Blood*, 2018, 132.24: 2594-2607.
- BOUDREAU, Jeanette E.; LE LUDUEC, Jean-Benoît; HSU, Katharine C. Development of a novel multiplex PCR assay to detect functional subtypes of KIR3DL1 alleles. *PloS one*, 2014, 9.6: e99543.
- BOUDREAU, Jeanette E., et al. KIR3DL1 and HLA-B density and binding calibrate NK education and response to HIV. *The Journal of Immunology*, 2016, 196.8: 3398-3410.
- BOUDREAU, Jeanette E., et al. KIR3DL1/HLA-B subtypes govern acute myelogenous leukemia relapse after hematopoietic cell transplantation. *Journal of Clinical Oncology*, 2017, 35.20: 2268.
- BOYINGTON, Jeffrey C.; SUN, Peter D. A structural perspective on MHC class I recognition by killer cell immunoglobulin-like receptors. *Molecular immunology*, 2002, 38.14: 1007-1021.
- CARR, William Henry; PANDO, Marcelo Jorge; PARHAM, Peter. KIR3DL1 polymorphisms that affect NK cell inhibition by HLA-Bw4 ligand. *The Journal of Immunology*, 2005, 175.8: 5222-5229.
- CARRILLO-BUSTAMANTE, Paola; KEŞMİR, Can; DE BOER, Rob J. The evolution of natural killer cell receptors. *Immunogenetics*, 2016, 68.1: 3-18.
- CARRINGTON, Mary; NORMAN, Paul. The KIR gene cluster. 2003.

CICHOCKI, Frank, et al. Diversification and functional specialization of human NK cell subsets. In: *Natural Killer Cells*. Springer, Cham, 2015. p. 63-93.

CICHOCKI, Frank; SITNICKA, Ewa; BRYCESON, Yenan T. NK cell development and function—plasticity and redundancy unleashed. In: *Seminars in immunology*. Academic Press, 2014. p. 114-126.

CIUREA, Stefan O., et al. Haploidentical transplant with posttransplant cyclophosphamide vs matched unrelated donor transplant for acute myeloid leukemia. *Blood*, 2015, 126.8: 1033-1040.

CLAUS, Maren, et al. SLAM family receptors in natural killer cells – Mediators of adhesion, activation and inhibition via cis and trans interactions. *Clinical Immunology*, 2018.

COLONNA, Marco; SAMARIDIS, Jacqueline. Cloning of immunoglobulin-superfamily members associated with HLA-C and HLA-B recognition by human natural killer cells. *Science*, 1995, 268.5209: 405-408.

COOLEY, Sarah, et al. Donor selection for natural killer cell receptor genes leads to superior survival after unrelated transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood*, 2010, 116.14: 2411-2419.

COOLEY, Sarah; PARHAM, Peter; MILLER, Jeffrey S. Strategies to activate NK cells to prevent relapse and induce remission following hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, 2018, 131.10: 1053-1062.

DAUSSET, Jean. Iso-leuko-antibodies. *Vox Sanguinis*, 1958, 3.1: 40-41.

DAVID, Gaëlle, et al. Large Spectrum of HLA-C Recognition by Killer Ig-like Receptor (KIR) 2DL2 and KIR2DL3 and Restricted C1 Specificity of KIR2DS2: Dominant Impact of KIR2DL2/KIR2DS2 on KIR2D NK Cell Repertoire Formation. *The Journal of Immunology*, 2013, 191.9: 4778-4788.

DAVIES, Stella M., et al. Evaluation of KIR ligand incompatibility in mismatched unrelated donor hematopoietic transplants. *Blood*, 2002, 100.10: 3825-3827.

DÖHRING, Christian; SAMARIDIS, Jacqueline; COLONNA, Marco. Alternatively spliced forms of human killer inhibitory receptors. *Immunogenetics*, 1996, 44.3: 227-230.

FALCO, Michela, et al. Natural killer cells: From surface receptors to the cure of high-risk leukemia (Ceppellini Lecture). *Hla*, 2019, 93.4: 185-194.

FAURIAT, Cyril, et al. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood*, 2010, 115.11: 2167-2176.

FREUD, Aharon G., et al. The broad spectrum of human natural killer cell diversity. *Immunity*, 2017, 47.5: 820-833.

GARDINER, Clair M., et al. Different NK cell surface phenotypes defined by the DX9 antibody are due to KIR3DL1 gene polymorphism. *The Journal of Immunology*, 2001, 166.5: 2992-3001.

GASSER, Stephan; RAULET, David H. Activation and self-tolerance of natural killer cells. *Immunological reviews*, 2006, 214.1: 130-142.

GÓMEZ-LOZANO, Natalia, et al. Some human KIR haplotypes contain two KIR2DL5 genes: KIR2DL5A and KIR2DL5B. *Immunogenetics*, 2002, 54.5: 314-319.

GORIN, Norbert Claude. Autologous stem cell transplantation versus alternative allogeneic donor transplants in adult acute leukemias. In: *Seminars in hematology*. WB Saunders, 2016. p. 103-110.

GRAEF, Thorsten, et al. KIR2DS4 is a product of gene conversion with KIR3DL2 that introduced specificity for HLA-A* 11 while diminishing avidity for HLA-C. *Journal of Experimental Medicine*, 2009, 206.11: 2557-2572.

GUPTA, Ravindra K., et al. HIV-1 remission following CCR5 Δ 32/ Δ 32 haematopoietic stem-cell transplantation. *Nature*, 2019, 1.

HANNA, Jacob, et al. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nature medicine*, 2006, 12.9: 1065. ORR, Mark T.; LANIER, Lewis L. Natural killer cell education and tolerance. *Cell*, 2010, 142.6: 847-856.

HEIDENREICH, Silke; KRÖGER, Nicolaus. Reduction of relapse after unrelated donor stem cell transplantation by KIR-based graft selection. *Frontiers in immunology*, 2017, 8: 41.

HENIG, Israel; ZUCKERMAN, Tsila. Hematopoietic stem cell transplantation—50 years of evolution and future perspectives. *Rambam Maimonides medical journal*, 2014, 5.4.

HOU, LiHua, et al. Limited allelic diversity of stimulatory two-domain killer cell immunoglobulin-like receptors. *Human immunology*, 2008, 69.3: 174-178.

HSU, Katharine C., et al. Killer Ig-like receptor haplotype analysis by gene content: evidence for genomic diversity with a minimum of six basic framework haplotypes, each with multiple subsets. *The journal of immunology*, 2002, 169.9: 5118-5129.

HSU, Katharine C., et al. The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotypes and allelic polymorphism. *Immunological reviews*, 2002, 190.1: 40-52.

CHIANG, Samuel CC, et al. Comparison of primary human cytotoxic T cell and natural killer cell responses reveal similar molecular requirements for lytic granule exocytosis but differences in cytokine production. *Blood*, 2013, blood-2012-07-442558.

JONCKER, Nathalie T., et al. NK cell responsiveness is tuned commensurate with the number of inhibitory receptors for self-MHC class I: the rheostat model. *The Journal of Immunology*, 2009, 182.8: 4572-4580.

KHAKOO, Salim I.; CARRINGTON, Mary. KIR and disease: a model system or system of models?. *Immunological reviews*, 2006, 214.1: 186-201.

KIM, Sungjin, et al. Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature*, 2005, 436.7051: 709.

KWON, Daeho, et al. Diversity of the p70 killer cell inhibitory receptor (KIR3DL) family members in a single individual. *Molecules and cells*, 2000, 10.1: 54-60.

LANIER, Lewis L., et al. Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells. *Nature*, 1998, 391.6668: 703.

LEE, Hwan Hee; KANG, Hyojeung; CHO, Hyosun. Natural killer cells and tumor metastasis. *Archives of pharmacal research*, 2017, 40.9: 1037-1049.

LEUNG, Wing, et al. Determinants of antileukemia effects of allogeneic NK cells. *The Journal of Immunology*, 2004, 172.1: 644-650.

LIU, Jingxian, et al. Activating killer cell immunoglobulin-like receptor 2DS2 binds to HLA-A* 11. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014, 111.7: 2662-2667.

LJUNGGREN, Hans-Gustaf; KÄRRE, Klas. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunology today*, 1990, 11: 237-244.

LOCATELLI, Franco, et al. Outcome of children with acute leukemia given HLA-haploidentical HSCT after $\alpha\beta$ T-cell and B-cell depletion. *Blood*, 2017, 130.5: 677-685.

LONG, Eric O. Negative signaling by inhibitory receptors: the NK cell paradigm. *Immunological reviews*, 2008, 224.1: 70-84.

MARSH, Steven GE, et al. Killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) nomenclature report, 2002. *Tissue antigens*, 2003, 62.1: 79-86.

MARTELLI, Massimo F.; AVERSA, Franco. Haploidentical transplants using ex vivo T-cell depletion. In: *Seminars in hematology*. WB Saunders, 2016. p. 252-256.

MARTIN, Annalise M., et al. Comparative genomic analysis, diversity and evolution of two KIR haplotypes A and B. *Gene*, 2004, 335: 121-131.

MARTIN, Annalise M., et al. The genomic organization and evolution of the natural killer immunoglobulin-like receptor (KIR) gene cluster. *Immunogenetics*, 2000, 51.4-5: 268-280.

MATHE, G., et al. Immunogenetic and immunological problems of allogeneic haemopoietic radio-chimaeras in man. *Scandinavian journal of haematology*, 1967, 4.3: 193-216.

MAXWELL, L. D., et al. A common KIR2DS4 deletion variant in the human that predicts a soluble KIR molecule analogous to the KIR1D molecule observed in the rhesus monkey. *Tissue antigens*, 2002, 60.3: 254-258.

MIDDLETON, Derek; GONZELEZ, Faviel. The extensive polymorphism of KIR genes. *Immunology*, 2010, 129.1: 8-19.

MOESTA, Achim K.; PARHAM, Peter. Diverse functionality among human NK cell receptors for the C1 epitope of HLA-C: KIR2DS2, KIR2DL2, and KIR2DL3. *Frontiers in immunology*, 2012, 3: 336.

MORETTA, Alessandro, et al. Existence of both inhibitory (p58) and activatory (p50) receptors for HLA-C molecules in human natural killer cells. *Journal of Experimental Medicine*, 1995, 182.3: 875-884.

MORETTA, Lorenzo. Dissecting CD56dim human NK cells. *Blood*, 2010, 116.19: 3689-3691.

OLCESE, Lucia, et al. Human killer cell activatory receptors for MHC class I molecules are included in a multimeric complex expressed by natural killer cells. *The Journal of Immunology*, 1997, 158.11: 5083-5086.

ORR, Mark T.; LANIER, Lewis L. Natural killer cell education and tolerance. *Cell*, 2010, 142.6: 847-856.

PARHAM, Peter. MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nature Reviews Immunology*, 2005, 5.3: 201.

PARHAM, Peter; MOFFETT, Ashley. Variable NK cell receptors and their MHC class I ligands in immunity, reproduction and human evolution. *Nature Reviews Immunology*, 2013, 13.2: 133.

PENDE, Daniela, et al. Analysis of the receptor-ligand interactions in the natural killer-mediated lysis of freshly isolated myeloid or lymphoblastic leukemias: evidence for the involvement of the Poliovirus receptor (CD155) and Nectin-2 (CD112). *Blood*, 2005, 105.5: 2066-2073.

PENDE, Daniela, et al. Anti-leukemia activity of alloreactive NK cells in KIR ligand-mismatched haploidentical HSCT for pediatric patients: evaluation of the functional role of activating KIR and redefinition of inhibitory KIR specificity. *Blood*, 2009, 113.13: 3119-3129.

PIEMONTESE, Simona, et al. A comparison between allogeneic stem cell transplantation from unmanipulated haploidentical and unrelated donors in acute leukemia. *Journal of hematology & oncology*, 2017, 10.1: 24.

RAULET, David H.; VANCE, Russell E.; MCMAHON, Christopher W. Regulation of the natural killer cell receptor repertoire. *Annual review of immunology*, 2001, 19.1: 291-330.

RAULET, David H. Missing self recognition and self tolerance of natural killer (NK) cells. In: *Seminars in immunology*. Academic Press, 2006. p. 145-150.

RITZ, JEROME, et al. Characterization of functional surface structures on human natural killer cells. *Adv Immunol*, 1988, 42.181: 32.

ROMAGNANI, Chiara, et al. CD56brightCD16⁺ killer Ig-like receptor⁺ NK cells display longer telomeres and acquire features of CD56dim NK cells upon activation. *The Journal of Immunology*, 2007, 178.8: 4947-4955.

RUGGERI, Loredana, et al. Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, 1999, 94.1: 333-339.

RUGGERI, Loredana, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science*, 2002, 295.5562: 2097-2100.

RUGGERI, Loredana, et al. Donor natural killer cell allorecognition of missing self in haploidentical hematopoietic transplantation for acute myeloid leukemia: challenging its predictive value. *Blood*, 2007, 110.1: 433-440.

RUGGERI, Loredana, et al. Identifying NK alloreactive donors for haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. In: *Tumor Immunology*. Humana Press, New York, NY, 2016. p. 141-145.

SELVAKUMAR, A.; STEFFENS, U.; DUPONT, B. NK cell receptor gene of the KIR family with two IG domains but highest homology to KIR receptors with three IG domains. *Tissue antigens*, 1996, 48.4: 285-295.

SHAFFER, Brian C.; HSU, Katharine C. How important is NK alloreactivity and KIR in allogeneic transplantation?. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 2016, 29.4: 351-358.

SHAH, Nina. Activating KIR: in Kase of KIR-ligand mismatch. *Blood*, 2015, 125.20: 3045-3046.

SHILLING, Heather G., et al. Genetic control of human NK cell repertoire. *The Journal of Immunology*, 2002, 169.1: 239-247.

SINGLE, Richard M., et al. Global diversity and evidence for coevolution of KIR and HLA. *Nature genetics*, 2007, 39.9: 1114.

SIVORI, Simona, et al. Extending killer Ig-like receptor function: from HLA class I recognition to sensors of microbial products. *Trends in immunology*, 2010, 31.8: 289-294.

STEWART, C. Andrew, et al. Recognition of peptide-MHC class I complexes by activating killer immunoglobulin-like receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005, 102.37: 13224-13229.

STRINGARIS, Kate, et al. Donor KIR Genes 2DL5A, 2DS1 and 3DS1 are associated with a reduced rate of leukemia relapse after HLA-identical sibling stem cell transplantation for acute myeloid leukemia but not other hematologic malignancies. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 2010, 16.9: 1257-1264.

SULLIVAN, L. C., et al. The major histocompatibility complex class Ib molecule HLA-E at the interface between innate and adaptive immunity. *Tissue antigens*, 2008, 72.5: 415-424.

SUN, Joseph C.; BEILKE, Joshua N.; LANIER, Lewis L. Adaptive immune features of natural killer cells. *Nature*, 2009, 457.7229: 557.

THIELENS, Ariane; VIVIER, Eric; ROMAGNÉ, François. NK cell MHC class I specific receptors (KIR): from biology to clinical intervention. *Current opinion in immunology*, 2012, 24.2: 239-245.

THOMAS, E. Donnall, et al. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *New England Journal of Medicine*, 1957, 257.11: 491-496.

TORKAR, Michaela, et al. Isotypic variation of novel immunoglobulin-like transcript/killer cell inhibitory receptor loci in the leukocyte receptor complex. *European journal of immunology*, 1998, 28.12: 3959-3967.

TROWSDALE, John. Genetic and functional relationships between MHC and NK receptor genes. *Immunity*, 2001, 15.3: 363-374.

UHRBERG, Markus; PARHAM, Peter; WERNET, Peter. Definition of gene content for nine common group B haplotypes of the Caucasoid population: KIR haplotypes contain between seven and eleven KIR genes. *Immunogenetics*, 2002, 54.4: 221-229.

VAN ACKER, Heleen H., et al. CD56 in the immune system: more than a marker for cytotoxicity?. *Frontiers in immunology*, 2017, 8: 892.

VILCHES, Carlos, et al. KIR2DL5, a novel killer-cell receptor with a D0-D2 configuration of Ig-like domains. *The Journal of Immunology*, 2000, 164.11: 5797-5804.

VILCHES, Carlos; PARHAM, Peter. KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annual review of immunology*, 2002, 20.1: 217-251.

VIVIER, Eric, et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science*, 2011, 331.6013: 44-49.

WAGTMANN, Nicolai, et al. Molecular clones of the p58 NK cell receptor reveal immunoglobulin-related molecules with diversity in both the extra-and intracellular domains. *Immunity*, 1995, 2.5: 439-449.

WALZER, Thierry, et al. Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force". *Blood*, 2005, 106.7: 2252-2258.

WENDE, Hagen, et al. Organization of the leukocyte receptor cluster (LRC) on human chromosome 19q13. 4. *Mammalian Genome*, 1999, 10.2: 154-160.

YAWATA, Makoto, et al. Roles for HLA and KIR polymorphisms in natural killer cell repertoire selection and modulation of effector function. *Journal of Experimental Medicine*, 2006, 203.3: 633-645.

SEZNAM INTERNETOVÝCH ZDROJŮ

CIBMTR, Historical Milestones in the Development of Stem Cell Transplantation. *Document Moved* [online]. Copyright © 2009 [cit. 31.03.2019]. Dostupné z: <https://www.cibmtr.org/Meetings/Materials/CRPDMC/Pages/feb09barrett.aspx>

EBI, IPD – KIR Introduction. *The European Bioinformatics Institute < EMBL-EBI* [online]. Copyright © EMBL, 2019a [cit. 17.03.2019]. Dostupné z: <https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/introduction.html>

EBI, IPD – KIR Introduction. *The European Bioinformatics Institute < EMBL-EBI* [online]. Copyright © EMBL, 2019b [cit. 17.03.2019]. Dostupné z: https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/images/figure_01.png

EBI, IPD – KIR Database Statistics. *The European Bioinformatics Institute < EMBL-EBI* [online]. Copyright © EMBL, 2019c [cit. 28.03.2019]. Dostupné z: <https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/stats.html>

EBI, IPD – KIR Ligand Calculator. *The European Bioinformatics Institute < EMBL-EBI* [online]. Copyright © EMBL, 2019d [cit. 30.03.2019]. Dostupné z: <https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/ligand.html>

EBI, IPD – KIR Sequence Database. *The European Bioinformatics Institute < EMBL-EBI* [online]. Copyright © EMBL, 2019e. [cit. 15.04.2019]. Dostupné z: https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/donor_b_content.html

EBI, Sequenced Haplotypes < KIR < IPD < EMBL-EBI. *The European Bioinformatics Institute < EMBL-EBI* [online]. Copyright © EMBL, 2019f. [cit. 22.04.2019]. Dostupné z: https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/sequenced_haplotypes.html